

上皮間葉転換と細胞運命の制御による難治性がん治療法開発

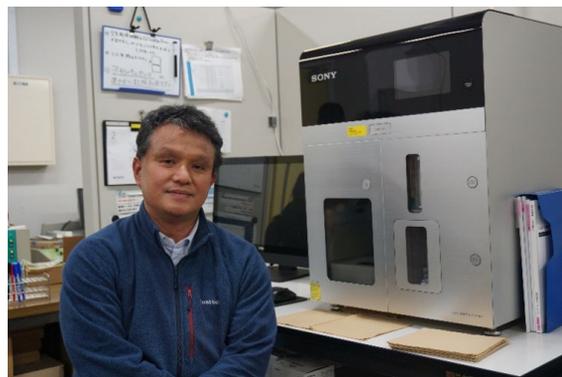
同志社女子大学薬学部・医療薬学科
薬物治療学研究室
吉川清次 教授

使用機種

セルソーター SH800S

使用用途

EMTレポーターを用いたがん幹細胞マーカー
などの発現パターン解析



吉川清次先生は、がんの多様性・不均一性の主要因と考えられる、上皮間葉転換を制御することによって、治療法が限定された難治性がんに対する新規治療法を見出すべく、精力的にご研究を進められている気鋭の研究者です。今回はお忙しい中、貴重なお時間をいただき、お話を伺いました。

—先生のご研究内容について教えてください。

がん幹細胞の性質を持った細胞を、異なる性質の細胞に分化誘導する研究を行っています。

がんがなかなか完治しない理由の1つには、がん細胞が様々なストレスに抵抗性をもち、性質を変化させることがあります。もともとがん細胞は、上皮細胞に由来していますが、抗がん剤などのストレスに晒されると、間葉細胞に変化します。これが上皮間葉転換です(図1)。

そして、間葉細胞はがんの幹細胞特性を有していると報告があります。つまり上皮間葉転換を起こすと造腫瘍性が上がるということになります。

それを受けて上皮間葉転換をin vitroで解析できる細胞株として、非腫瘍性の不死化ヒト乳腺上皮細胞(HMLE)が作製されました(図2)。これは正常乳腺上皮細胞に、テロメラーゼを導入、不死化し、SV40ウイルスラージT抗原を導入し、がん抑制遺伝子を不活化した乳腺細胞で、前がん細胞ということになります。

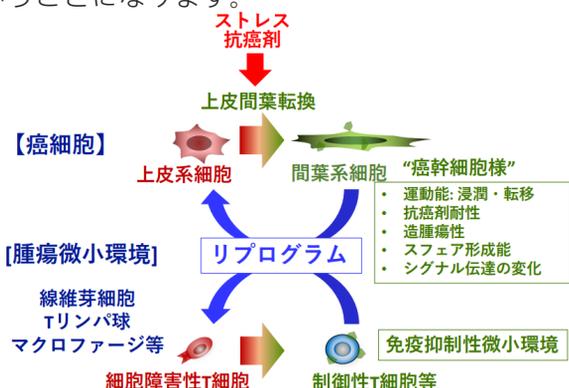


図1：上皮間葉転換と腫瘍微小環境

このHMLEに、がん遺伝子H-Ras遺伝子を導入すると、HMLER細胞(図2および次頁表1参照、以下RDPと呼ぶ)になります。RDPは上皮系の細胞ですが、上皮間葉転換により間葉細胞に変化できます。HMLER細胞の、上皮細胞であるRDPは接着力がなくなると生育できませんが、間葉細胞は、接着力を消失しても増殖します。私は2008年頃からがん幹細胞の研究をしていますが、現在最も着目しているのは、このHMLER間葉細胞(H-Rasがん遺伝子が導入され、間葉転換したHMLE細胞、以下RSPと呼ぶ)です。これががん幹細胞に相当しており、最も悪性度が高いです。ちなみにHMLEは、不死化されているので正常とは言い難いですが、がん一步手前の状態です。私はそれらを研究材料に、何としても、RSPを排除したいと思いました。

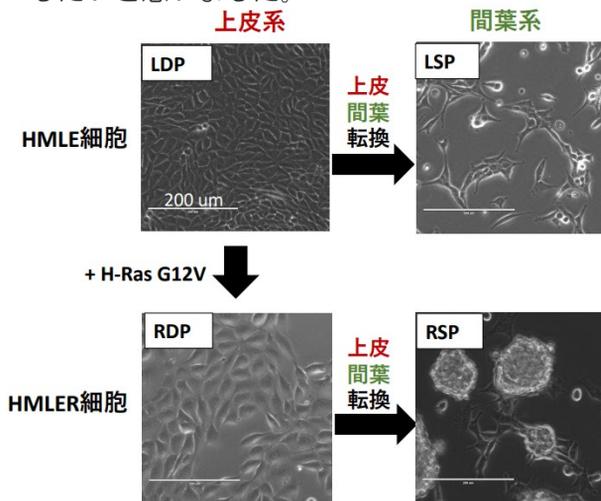


図2：in vitro解析における上皮間葉転換前後の乳腺細胞株

そこで考えついたのが「脂肪分化をさせる」ことでした。ロシグリタゾンなど薬剤を使用して、RSPの脂肪分化を試みると、脂肪マーカーをもとにその効果を解析できるのではないかと思います。

それで始めたのが、現在行っているがん幹細胞の脂肪分化の実験です。

表1: in vitro解析における上皮間葉転換前後の細胞株: 名称と特徴

細胞名	特徴
HMLE	不死化ヒト乳腺由来細胞 (Tert遺伝子・SV40 LT抗原導入)、前がん細胞としての特徴を持つ。
HMLER	HMLE細胞をH-Ras V12がん遺伝子で形質転換した細胞。上皮系のため接着力がなくなると生育できないが (RDP)、上皮間葉転換で間葉細胞に変化すると、足場非依存性増殖能を獲得する (RSP)。
LDP	HMLEの上皮細胞、CD44 ⁺ CD24 ⁺
LSP	HMLEの間葉細胞、CD44 ^{hi} CD24 ^{lo}
RDP (Ras上皮)	HMLERの上皮細胞、CD44 ⁺ CD24 ⁺
RSP (Ras間葉)	HMLERの間葉細胞、CD44 ^{hi} CD24 ^{lo} がん幹細胞に相当、最も悪性度が高い。

一脂肪分化誘導のご研究において、セルソーターSH800Sはどのようにご使用いただいていますか？

まず、上皮細胞・間葉細胞を区別するためのルーチンワークとして、SH800Sを使用しています。Rasの導入されていないHMLE間葉細胞 (以下LSPと呼ぶ) においては、CD24^{low} CD44^{hi}の発現パターンが見られます。一方でHMLE上皮細胞 (以下LDPと呼ぶ) はCD24とCD44のダブルポジティブとなりますが、CD44の発現はLSPと比較すると少し低くなります。そのような理由で、CD24とCD44の発現の差で、上皮細胞と間葉細胞が区別できることとなります。

また、本題の、RSPに脂肪分化の誘導がかかったかの判別においても、ロシグリタゾンを添加した場合における、CD36 (脂肪酸のトランスポーターマーカー) の発現変化を確認しています。そうするとRSP細胞では脂肪分化誘導がかかるのに対して、上皮細胞ではこの誘導がかからないことが分かっています。勿論この時、脂肪滴が出てくることも蛍光顕微鏡で確認しています。ただ、これが良性なのか悪性なのかは解明できていないため、そちらを今解析しようとしています。

そして、私の作製した新規EMT/MET dualレポータープラスミドと、細胞周期の進行をモニターするFucciのレポーターを用いた実験でも、SH800Sを使用しています。

そのプラスミドをRSPやコントロールに導入し、ロシグリタゾンを添加した場合に、EMTの状況がどのように変わるかを解析しています。EMTレポータープラスミドにおいては、間葉転換が起こると発現が高くなるのがVimentin、上皮細胞だとE-Cadherinなので、それらを蛍光タンパク (それぞれmCherry、GFP) の発現で比較することができます (図3)。

それに加え、Fucciのレポーターでは、ロシグリタゾンの影響やEMTの状況により、細胞周期が変化するかを同時並行で確認することができます。これについては現状、レポーターと蛍光抗体染色が十分ワークしていることがいえそうです。

このようにレポーターを作製することにはメリットがあります。例えば乳がん、上皮系と、上皮と間葉系の間と、間葉系の細胞株がそろっている場合を考えます。この乳がん細胞のパネルでは、まず、CD44とCD24のプロファイルを、染色によって2色の蛍光色素で区別することができますし (上皮・間葉の判別)、ここに、さらにEMTレポーターを組み込むと、同時にE-Cadherinプロモーター活性をGFPで、Vimentinプロモーター活性をmCherryで確認できることとなります。そうすると全部で4色の蛍光になりますが、さらにここへ、CD36を見るため別の色素も追加するとたった計5色で「EMTの状況と、上皮細胞・間葉細胞における脂肪分化の差」が同時に把握できます。このような実験ではSH800Sはとても役に立っています。

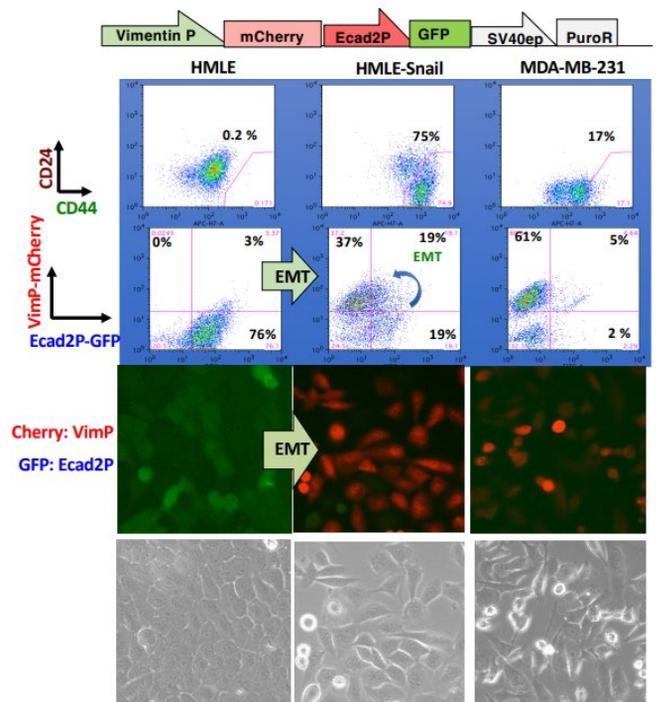


図3: 新規 EMT/MET dual レポータープラスミド

—臨床応用において、そのようなレポーターシステムはどのように活用できるでしょうか。

EMTレポーターシステムを作るメリットは、間葉転換を起こしやすい細胞の、治療法探索に役立つ可能性があることです。

たとえば乳がんにおいては、間葉系の乳がん細胞が最も悪性で、これに対する治療法がないです。一方で上皮細胞であるMCF7細胞株はエストロゲンの受容体を発現しているため女性ホルモンを抑える治療法が有効です。一応、HER2陽性乳がん細胞にはtrastuzumab(商品名ハーセプチン)という抗体治療薬がありますが、これも上皮系の細胞なので、間葉転換を起こしやすい細胞に対しては治療法が今のところ、抗がん剤のみになります。さらに間葉細胞は免疫抑制サイトカイン(たとえばTGF-β)を放出しているといわれているので、免疫チェックポイント阻害剤のような免疫療法が出てきても、依然として間葉細胞自体にアプローチしなければがんは治らないという課題があります。そのような背景もあり、「間葉転換を起こした細胞の性質を変えられたら新規治療法につながらないか?」と考えました。

そのような経緯で私が京大時代に研究していたのが、先ほどの新規EMT/MET dualレポータープラスミドの原型となるプラスミドを用いた、「上皮化shRNAのスクリーニング」です。E-Cadherinのレポータープラスミドの下流に、ブラストサイジン薬剤耐性遺伝子とGFPの融合遺伝子を配置し、これを間葉系細胞に入れると、上皮化した細胞だけが緑に発光し、かつ、ブラストサイジンへの耐性を獲得します。上皮化した細胞はブラストサイジンによるポジティブセレクションで生き残る、というスクリーニングが可能になります(図4, 5)。

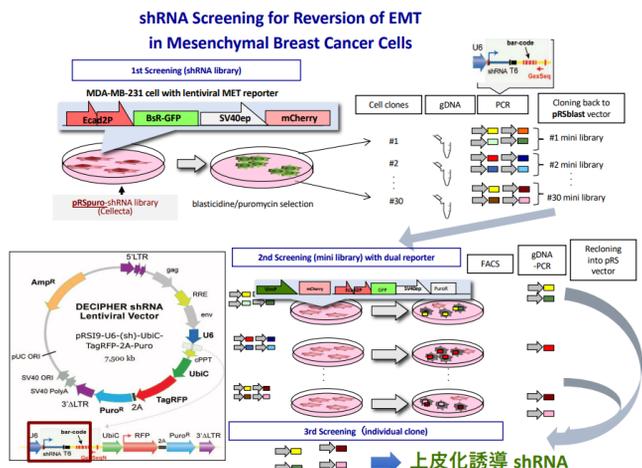


図4：METスクリーニングの概念

その“緑に光って生き残った上皮細胞”は“特定のshRNAが間葉細胞を上皮化することができた証拠”になります。そのスクリーニングで発見された、上皮化を誘導できるshRNA(図5)を、私は解析しています。

私としては上皮化することで様々な治療が効きやすくなるのではないかと、思っています。そのようなわけで、dualレポーターは臨床応用だと、間葉転換を起こしやすい細胞の治療法探索に大きく役立ちます。

—先生は、もともとは外科医でいらっしゃいますが、どのような経緯で現在のご研究を始められたのですか？

研究に戻ったきっかけとしては、浜松労災病院の外科に所属していた4年間の経験が大きかったです。当時、外科部長の先生で、非常に研究熱心で熱血感のある方がいらして、その先生は外科手術の合間に、ハーパー生化学の英語版を、漫画本みたいに読んでいるんですね。その先生曰く、自分の研究していたことがどこまで進展したかを知りたいということでしたが、私にも“大学院にいかないのか?”と後押しして下さったのが、私が研究に戻ろうと思った一つのきっかけになりました。

また、外科医の経験を積む中、がんがどんどん悪くなる患者さんを沢山見てきたので、そうした経験ががん研究を始めるにあたっての一番大きなモチベーションとなりました。やはり手術だけではだめだ、がんを根治するための研究をしたいと思いました。がん抑制遺伝子のことも解明されはじめた頃と時期も重なり、モチベーションも高まったという経緯がありました。

shP1 induce MET and reduce soft agar-colonogenicity in SUM159.

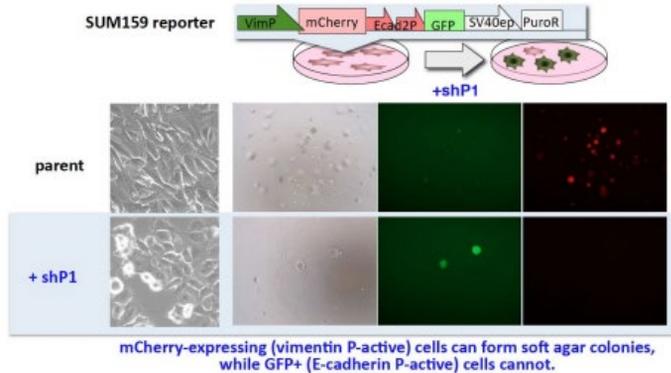


図5：shP1によるMET誘導と軟寒天コロニー形成低下

——一番印象的な発見は何でしたか？

本庶研に所属していた時代もレポーターを扱っていたのですが、「レポーターは体の中の複雑な現象を、単純な細胞で置き換えることができる」ということをまさに実感して、その時の快感がなかなか忘れられないです。

AIDという抗体の親和性成熟に関する分子があります。体の中でAID遺伝子が働くと抗体の可変部位に変異が入り、抗原に結合しやすくなります。私が研究していたのは、GFPに変異を入れたプラスミドのレポーターで、そのGFPは線維芽細胞の中に導入しても光らないんですね。ただ、そこにAID遺伝子をレトロウイルスで送り込むと、GFPに変異が入って、たまたまコードするGFPの配列になると、線維芽細胞の中で光り始めます。ちなみにこのGFPの変異遺伝子の上流には、テトラサイクリン（タンパク質合成阻害剤）反応性のプロモーター配列が置いてあります。そしてそのテトラサイクリンで、転写をONにしたときだけGFPに変異が入ることが分かりました。そのようなレポーター実験をしていたのですが、つまるところ、これは「抗体遺伝子の体細胞突然変異と同じ現象（体内で起こる複雑な現象）が、レポーターを使用すると線維芽細胞の中だけでも可視化することができた」ということですね。

次に印象的な発見だったのは、shRNAスクリーニングで別々に単離した2つの上皮化shRNA内部に、共通の配列を同定したときです。大晦日誰もいないラボで、配列を解析していると、一部、鍵になりそうな配列が見つかったんですね。これには感激しました。今考えても感動的で、神に近づいた気がしました。ただ、その配列は2008年にもう報告されていた、というオチがあったのですが、神に近づいたと同時に、奈落の底に一気に突き落とされたようでした(笑)。ただ、自身で一から作製した手作りのshRNAライブラリのスクリーニングの実験系が間違っていなかったということで、やはり心に残っていますね。

——今後の展望についてお伺いしたいです。

治療法に応用できるかの判断として、脂肪分化した細胞が良性か悪性かは検証したいと思っています。ロシグリタゾンは、II型糖尿病に対する薬の1つで、PPAR- γ 活性化を介して、脂肪細胞の成熟分化を促し、ブドウ糖の取込を促進します。糖尿病を持つ乳がんや他のがん患者さんが、PPAR- γ 活性化薬を服用している可能性があります。脂肪分化誘導後の乳癌細胞の表現型が良いのか悪いのかはしっかり確認しておかないと、

さらに脂肪分化の薬を使用した時に、乳がんに対しても悪影響を及ぼしているとなったら大変です。そのようなわけで脂肪分化した細胞の性状は調べなければと思っています。

——最後に学生さんや研究者の方々に送るメッセージはありますか？

がんというのは、ジェネティックとエピジェネティックの両方の多様性を以て生き延びているというのが私の思っていることで、学生さんたちがこの厳しい世の中を生き残っていくために、「がん細胞に学び、可塑性と多様性をもって生きていただきたい」と思っています。

——有難うございました。

参考文献

- ・ Sendurai A. Mani et. al, "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells," Cell 133 (2008): 704-715
- ・ Elenbaas, B. et. al, "Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells." Genes Dev. 15 (2001): 50-65
- ・ Kei Takahashiet.al, "Visualization of the cancer cell cycle by tissue-clearing technology using the Fucci reporter system," Cancer Science Volume 112 (2021) : 3796-3809
- ・ 学校法人 関西文理総合学園 長浜バイオ大学ホームページ
<https://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/%E6%95%99%E5%93%A1%E3%81%AE%E7%B4%B9%E4%BB%8B%EF%BC%88%E5%90%89%E5%B7%9D-%E6%B8%85%E6%AC%A1%EF%BC%89/>
- ・ 科学研究費助成事業 研究成果報告
上皮間葉転換と細胞運命制御因子を標的にした難治性癌治療法の開発
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-18K07335/18K07335seika.pdf>
- ・ 科学研究費助成事業 研究成果報告
高感度人工レポーターを用いた乳がん幹細胞治療標的遺伝子の発現クローニング
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-24650620/24650620seika.pdf>

セルソーターSH800S

簡単セットアップ・小型化を実現した“日本発”セルソーター

- ・ 96/384シングルセルソート
(SPモデル/384はオプション)
- ・ 目的に応じてオリフィスサイズを選択できるディスパーザブルソーティングチップ
- ・ 直感に訴えるユーザーフレンドリーなソフトウェア



発行元

ソニー株式会社
ライフサイエンス&テクノロジー事業部
〒220-8750 神奈川県横浜市西区みなとみらい5-1-1
Tel: 0120-667-010
URL: <http://www.sony.co.jp/LS>

